

原発性非小細胞肺癌におけるBcl-2蛋白およびp53蛋白発現の 予後因子としての意義について

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任：渡辺洋宇教授)

大 竹 由 美 子

原発性非小細胞肺癌168例を対象に Bcl-2 蛋白およびp53蛋白の発現を免疫組織学的に評価し、肺癌の予後因子としての意義を検討した。Bcl-2 蛋白発現の陽性率は全体29.8%、組織型別では扁平上皮癌が38.4%と腺癌23.7%に対し有意に高かった ($p<0.05$)。病期別の Bcl-2 蛋白発現陽性率はⅠ期、Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期の4群間では有意差はみられなかったがⅠ、Ⅱ期とⅢ、Ⅳ期の2群間の検討ではⅠ、Ⅱ期で有意に陽性率が高かった ($p<0.05$)。性別、年齢、T因子、N因子、M因子の検討でも Bcl-2 蛋白発現陽性率に有意差は認められなかったが、生存率との相関では Bcl-2 蛋白発現陽性症例が陰性症例に対し有意に良好な予後を示した ($p<0.05$)。これを組織型別にみた場合、腺癌では Bcl-2 蛋白発現陽性例と陰性例で予後に差は認められなかった。扁平上皮癌では Bcl-2 蛋白発現陽性例は陰性例に対し有意に予後が良好であった ($p<0.05$)。p53蛋白発現の陽性率は全体で62.5%、組織型別では扁平上皮癌で71.2%と腺癌57.0%に対し高かったが、有意差は認められなかった。性別、年齢、病期、T因子、N因子、M因子の検討でもp53蛋白発現陽性率に有意差は認められなかった。生存率との相関ではp53蛋白発現陽性症例が陰性症例に対し有意に不良な予後を示した ($p<0.05$)。Bcl-2 蛋白発現とp53蛋白発現の予後因子としての有用性を検討したところ全体および腺癌ではp53蛋白発現のみが有用であり、扁平上皮癌では Bcl-2 蛋白発現のみが有用であった。以上の結果から原発性非小細胞肺癌における Bcl-2 蛋白発現は扁平上皮癌に多くみられ、原発性非小細胞肺癌、ことに腺癌におけるp53蛋白発現および扁平上皮癌における Bcl-2 蛋白発現はともに有用な予後因子となりうると考えられた。

Key words non-small cell lung cancer, Bcl-2 protein, p53 protein, apoptosis, prognostic factor

肺癌症例では臨床的に予後が良好と考えられる群においても不良な予後を呈するものが少なからず見うけられ、臨床的、病理組織学的予後因子のみならず、細胞生物学的予後因子が関与している¹⁾。なかでも癌遺伝子および癌抑制遺伝子の関与がさまざまな研究者によって検討されている。Bcl-2 はヒト濾胞性リンパ腫で認められたt (14; 18) (q32; q21) の転座点近傍に存在する癌遺伝子で、アポトーシスを抑制することが知られている^{2) 4)}。他の多くの癌遺伝子とは異なり、直接細胞増殖に関与するのではなく、アポトーシスを介して細胞増殖に関与する⁵⁾。またp53は癌抑制遺伝子のひとつであるが、これが欠損あるいは変異するとアポトーシスが誘導されず、損傷DNA が複製され発癌の一因となる^{6) 7)}。

本研究ではこれらのアポトーシス制御に関わる癌関連遺伝子の発現を免疫組織学的に評価し、肺癌の予後因子としての意義を検討した。

対象および方法

Ⅰ. 対 象

1987年1月から1991年12月までに金沢大学医学部第一外科学教室で外科的治療を行った原発性非小細胞肺癌症例のうち病院病理部に保存されている168症例のパラフィンブロックを対象とした。男性121例、女性47例、であり年齢は37歳から84歳 (平均65.3歳) であった。肺癌取り扱い規約⁸⁾による病期分類の内訳

は、Ⅰ期59例、Ⅱ期29例、Ⅲ_A期44例、Ⅲ_B期29例、Ⅳ期7例であり、組織型別では腺癌95例、扁平上皮癌73例であった。

Ⅱ. 免疫組織染色法

1. Bcl-2

Bcl-2 に対するパラフィン包埋された癌組織を4μmの厚さに薄切し、シランコーティングスライド (武藤化学、東京) に付着させ、100%キシレンで10分間、3回の脱パラフィンを行った後、100%、100%、100%、90%、70%のエタノールにて各3分間親水し、流水水洗した。次に0.01Mクエン酸緩衝液 (0.1Mクエン酸) 2.1gを蒸留水1000mlに溶かし、2Nの水酸化ナトリウムにてpH6.0に調整) にて500W、5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行った。その後20分間室温にて0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを阻害した。次にウシ正常血清 (ダコジャパン、京都) を用いてブロッッキングを行い、pH7.2のリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて洗浄し、抗 Bcl-2 蛋白抗体 (Clone 124) (ダコジャパン) を PBS にて40倍に希釈し、室温で1時間反応させた。続いて PBS にて5分間、3回洗浄後、ビオチン標識抗マウス、抗ウサギ・ヤギ抗体 (ダコジャパン) を用いて室温にて20分間反応させ、PBSで5分間、3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ダコジャパン) で室温にて20分間反応させた。発色剤は四塩酸3, 3'-ジアミノベンチジン (3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (和光、東京) 20mgを100mlのPBSに溶解し、10μl 130%過

平成8年12月3日受付、平成9年1月20日受理

Abbreviations : DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; PBS, phosphate-buffered saline

酸化水素水を加えて作製した。PBSで5分間、3回洗浄後、この発色剤を用い室温にて顕微鏡で発色状態を確認しながら3～7分間反応させ10分流水水洗し、マイヤー・ヘマトキシリン（武藤化学）にて1分間核染色を行った。その後流水水洗にて10分間色出しを行った。90%, 100%, 100%, 100%のエタノールにて各3分間の脱水を行った後、100%キシレンにより3分間、3回の透徹を行い、マリノール（武藤化学）にて封入を行った。

2. p53

パラフィン包埋された癌組織を4 μ mの厚さに薄切し、シランコーティングスライドに付着させ、100%キシレンで10分間、3回の脱パラフィンを行った後、100%, 100%, 100%, 90%, 70%のエタノールにて各3分間親水し、流水水洗した。次に0.01Mクエン酸緩衝液中にて500W, 5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行った。その後20分間室温にて0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを阻害した。次にウシ正常血清を用いてブロッッキングを行い、PBSにて洗浄し、抗p53蛋白抗体(DO-7)（ダコジャパン）をPBSにて100倍に希釈し、室温で1時間反応させた。続いてPBSにて5分間、3回洗浄後、ビオチン標識抗マウス、抗ウサギ・ヤギ抗体を用いて室温にて20分間反応させ、PBSで5分間、3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで室温にて20分間反応させた。PBSで5分間、3回洗浄後、発色剤で室温にて顕微鏡で発色状態を確認しながら

3～7分間反応させ、10分間流水水洗し、マイヤー・ヘマトキシリンにて1分間核染色を行った。その後流水水洗にて10分間色出しを行った。90%, 100%, 100%, 100%のエタノールにて各3分間脱水を行った後、100%キシレンにより3分間、3回の透徹を行い、マリノールにて封入を行った。

Ⅲ. 免疫組織染色の判定

透過顕微鏡画像解析装置 CAS200イメージ分析装置 (Cell Analysis System, Elmhurst, USA) を用い免疫組織染色強度を定量的に測定した。マイヤー・ヘマトキシリンによる核染色は620nmの波長で測光し、DABの染色強度(OD)は500nmの波長で測光した。

1. Bcl-2の染色強度の測定

Bcl-2の染色強度の測定には細胞計測プログラムを用い、細胞質の平均吸光度を測定した。陰性標準標本の平均吸光度測定は5標本から任意に選択した10～15視野でおこなった。染色標本の平均吸光度測定は腫瘍のリンパ球浸潤の少ない部分を任意に選択し、10～15視野でおこなった。陰性標準標本の吸光度測定により得られた値の平均値をもとめ、平均値以上を陽性、平均値未満を陰性と判定した。

2. p53の染色強度の測定

p53の染色強度の測定には、ER/PR定量分析法を用い、全核面積に対するDABで発色した核の面積比（陽性面積比、%

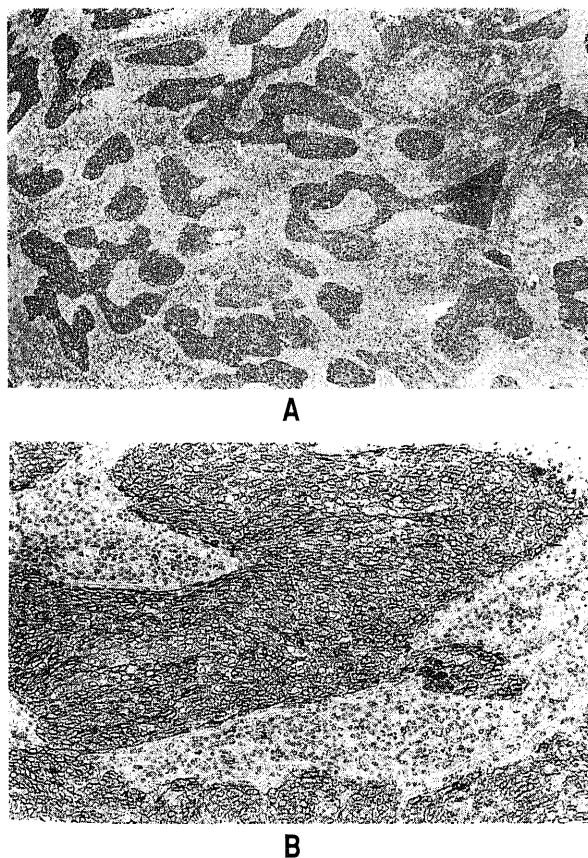


Fig.1. Immunohistochemical staining of Bcl-2 in epidermoid carcinoma. The cytoplasm of Bcl-2 protein positive cell was stained strongly (A), $\times 40$; (B), $\times 400$.

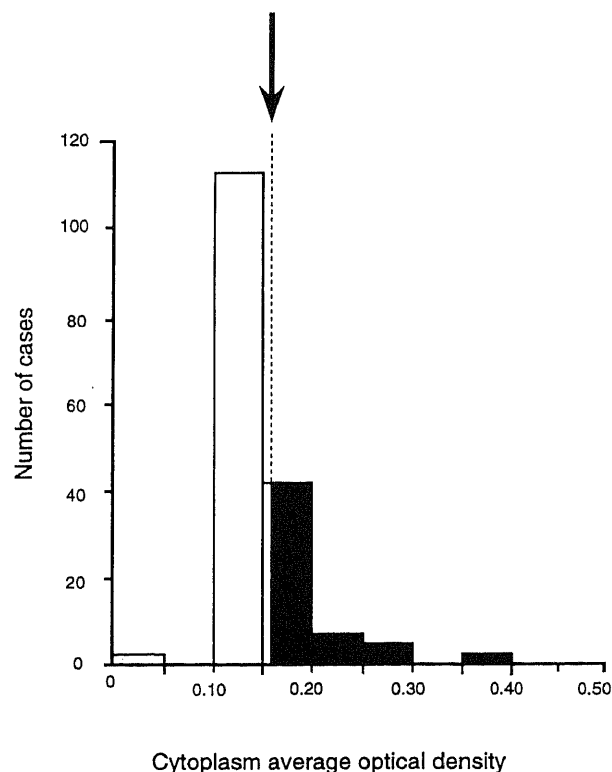


Fig.2. Histogram of average optical density of Bcl-2 staining in cytoplasm. The cut off point was defined as 1.052, which is the average in negative control study (arrow). The cytoplasm average optical density of less than 1.052 was regarded as Bcl-2 protein-positive, and that of 1.052 or more was regarded as Bcl-2 protein negative.

positive area) の測定をおこなった。陰性標準標本の平均吸光度測定は5標本から任意に選択した10~15視野でおこなった。染色標本の平均吸光度測定は腫瘍辺縁部の任意の視野を選び、10~15視野でおこなった。陰性標準標本の吸光度測定により得られた値の平均値をもとめ、平均値以上を陽性、平均値未満を陰性と判定した。

IV. 臨床病理学的因子

臨床病理学的因子として性別、年齢 (60才以上、未満)、組織型、病期、T因子、N因子、M因子を選択した。各因子について Bcl-2 蛋白およびp53蛋白の発現率を比較検討した。また、全症例および組織型別に、Bcl-2 およびp53蛋白発現の有無にて遠隔期生存率を比較検討した。病期、Bcl-2 蛋白発現率、p53蛋白発現率については全症例および組織型別に、生存率への関与度についても検討を加えた。

V. 統計学的処理

測定値はすべて平均±標準偏差で示した。前述の臨床病理学的因子間における Bcl-2 およびp53蛋白発現率の差の検定には χ^2 検定を用いた。生存率は Kaplan-Meier 法にて算出し、その有意差検定は Logrank 法にて行った。また、生存率への関与度についての変数解析には Cox 比例ハザードモデルを用いた。いずれも危険率が5% 未満の場合 ($p<0.05$) を統計的に有意差ありと判定した。

成 績

I. Bcl-2 蛋白発現陽性率と臨床病理学的因子との相関

1. Bcl-2 蛋白発現率

陰性標準標本の吸光度測定により得られた平均 OD 値は 1.052 ± 0.32 ($n=62$) であった。OD 値1.052以上を陽性 (Bcl-2 蛋白発現)、1.052未満を陰性と判定した。Bcl-2 免疫染色像 (肺扁平上皮癌) (図1) および CAS200 によって得られた Bcl-2 蛋白の染色強度のヒストグラムを示す (図2)。Bcl-2 蛋白発現陽性例は53例 (29.8%) に認められた。

2. 臨床病理学的因子との相関

表1に各臨床病理学的因子別の陽性率を示した。組織型別では扁平上皮癌症例の陽性率38.4%が腺癌症例の陽性率23.7%に比し有意に高値であった ($p<0.05$)。病期別の陽性率ではI期37.3%、II期34.5%、III_A期22.0%、III_B期21.9%、IV期28.6%と病期進行とともに、有意差はなかったが陽性率が下がる傾向があった。I、II期症例とIII、IV期症例との比較では、前者の陽性率36.4% (32/88例) は後者の陽性率22.5% (18/80例) に比し有意に高値であった ($p<0.05$)。性別、年齢 (60歳以上、60歳未満)、T因子、N因子、M因子による差はなかった。

Bcl-2 蛋白発現陽性/陰性別の全症例の遠隔期生存率は、12ヶ月生存率が85.7%/74.4% (陽性/陰性、以下同様)、36ヶ月生存率

Table 1. Lack of correlation between clinicopathological factors and incidence of Bcl-2 and p53 protein in 168 non-small cell lung cancer cases

	No. (%) of cases	Ratio (%) of Bcl-2 protein-positive cases	Ratio (%) of p53 protein-positive cases
All	168	50 (29.8)	105 (62.5)
Sex			
male	121 (72.0)	32 (26.4)	86 (71.1)
female	47 (28.0)	18 (38.3)	19 (40.4)
] NS	
Age (years)			
≤ 60	50 (29.8)	16 (32.0)	34 (68.0)
> 60	118 (70.2)	34 (28.8)	71 (60.2)
] NS	
Histology			
Adenocarcinoma	93 (55.4)	22 (23.7)	53 (57.0)
Epidermoid carcinoma	73 (44.6)	28 (38.4)	52 (71.2)
] $p<0.05$	
Stage			
I	59 (35.1)	22 (37.3)	32 (54.2)
II	29 (17.3)	10 (34.5)	19 (65.5)
III _A	41 (24.4)	9 (22.0)	29 (70.1)
III _B	32 (19.0)	7 (21.9)	20 (62.5)
IV	7 (4.2)	2 (28.6)	5 (71.4)
] NS	
T factor			
1	51 (30.3)	14 (27.5)	31 (60.8)
2	66 (39.3)	22 (33.3)	44 (66.7)
3	30 (17.9)	8 (26.7)	15 (50.0)
4	21 (12.5)	6 (28.5)	15 (71.4)
] NS	
N factor			
0	83 (49.4)	28 (33.7)	48 (57.8)
1	32 (19.0)	10 (31.3)	20 (62.5)
2	43 (25.6)	12 (27.9)	31 (72.1)
3	10 (6.0)	0 (0.0)	6 (60.0)
] NS	
M factor			
0	163 (97.0)	49 (30.1)	102 (62.6)
1	5 (3.0)	1 (20.0)	3 (60.0)
] NS	

The ratio of Bcl-2 protein-positive cases in epidermoid carcinoma was higher than that in adenocarcinoma ($p<0.05$). Chi-square test was performed. NS, not significant.

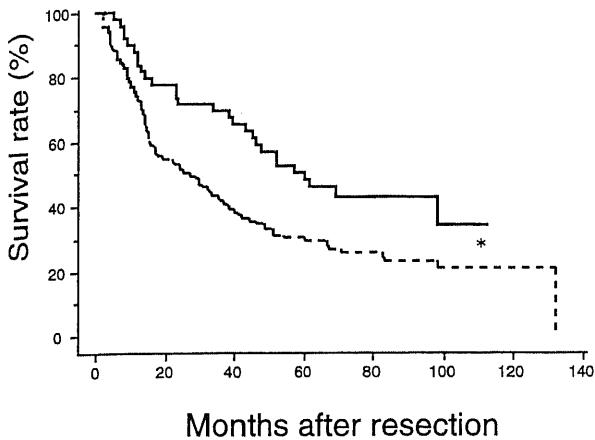


Fig.3. Survival curves of non-small cell lung cancer patients with Bcl-2 protein positive or negative. —, Bcl-2 protein positive cases; ----, Bcl-2 protein negative cases. * $p < 0.05$, by Logrank test.

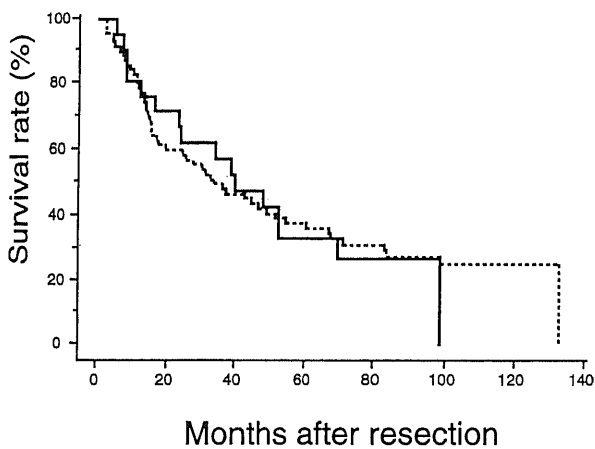


Fig.4. Survival curves of patients with adenocarcinoma with Bcl-2 protein positive or negative. —, Bcl-2 protein positive cases; ----, Bcl-2 protein negative cases.

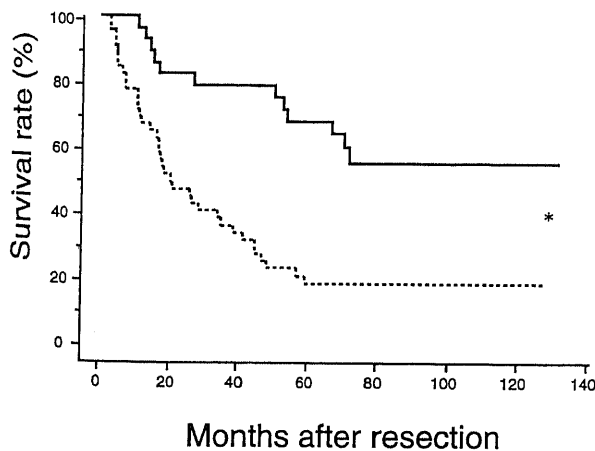


Fig.5. Survival curves of patients with epidermoid carcinoma with Bcl-2 protein positive or negative. —, Bcl-2 protein positive cases; ----, Bcl-2 protein negative cases. * $p < 0.05$, by Logrank test.

で69.4%/41.6%, 60ヶ月生存率で48.2%/29.2%であり, Bcl-2 蛋白陽性例は陰性例に比し有意に生存率が良好であった ($p < 0.05$) (図3). 組織型別にみた場合, 腺癌症例の遠隔期生存率は, 12ヶ月生存率で81.0%/78.6% (陽性/陰性, 以下同様), 36ヶ月生存率で57.1%/38.1%, 60ヶ月生存率で33.3%/36.3%であり, Bcl-2 蛋白陽性, 陰性例間に差はなかった (図4). 扁平上皮癌症例の遠隔期生存率は, 12ヶ月生存率で92.9%/66.7% (陽性/陰性, 以下同様), 36ヶ月生存率で78.6%/31.1%, 60ヶ月生存率で59.2%/17.8%であり, Bcl-2 蛋白陽性例は陰性例に比し有意に生存率が良好であった ($p < 0.05$) (図5).

II. p53蛋白発現陽性率と臨床病理学的因子の相関

1. p53蛋白発現の判定

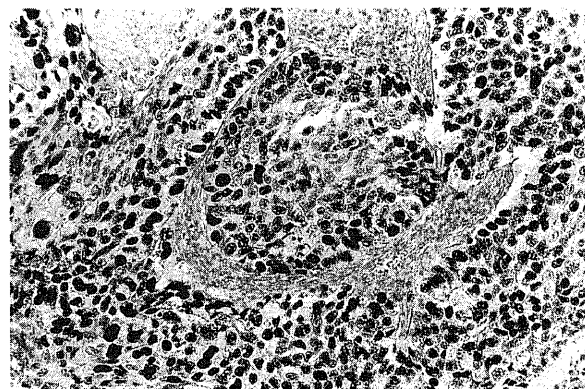
陰性標準標本の吸光度測定により得られた平均陽性面積比値は 3.62 ± 0.44 ($n=62$) であった. 陽性面積比値3.62以上を陽性 (p53蛋白発現), 3.62未満を陰性と判定した. 免疫染色像 (肺扁平上皮癌) (図6) およびCAS200によって得られたp53蛋白の染色強度のヒストグラムを示す (図7). p53蛋白発現陽性例は105例 (62.5%) に認められた.

2. 臨床病理学的因子との相関

病期別の陽性率ではI期54.2%, II期65.5%, IIIA期70.1%, IIIB期62.5%, IV期71.4%と病期進行とともに, 有意差はなかったが陽性率が上がる傾向があった. I, II期症例とIII, IV期症例との比較でも, 前者の陽性率58.0% (51/88例) と後者の陽性率



A



B

Fig.6. Immunohistochemical p53 staining in epidermoid carcinoma. The nuclear of p53 protein positive cell was stained strongly (A), $\times 40$; (B), $\times 400$.

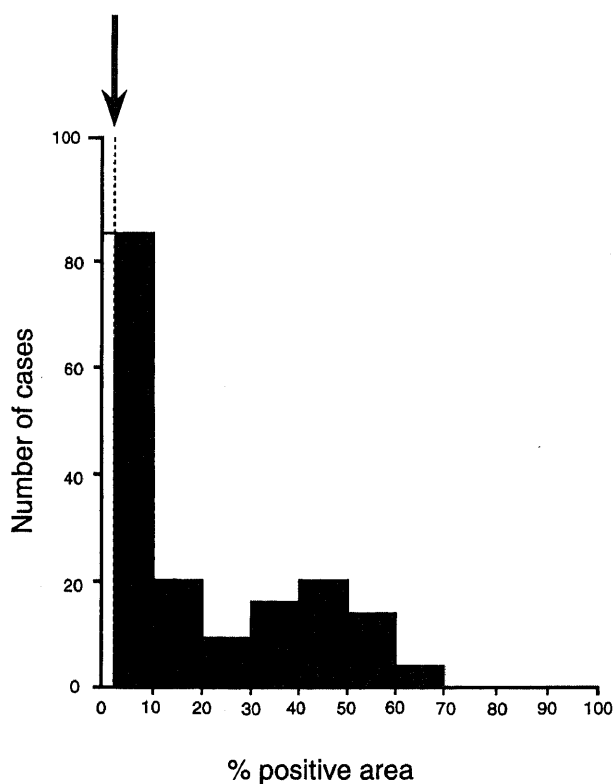


Fig.7. Histogram of % positive area of p53 staining. The cut off point was defined as 3.62, which is the average in negative control study (arrow). The % positive area of less than 3.62 was regarded as p53 protein positive, and that of 3.62 or more was regarded as p53 protein negative.

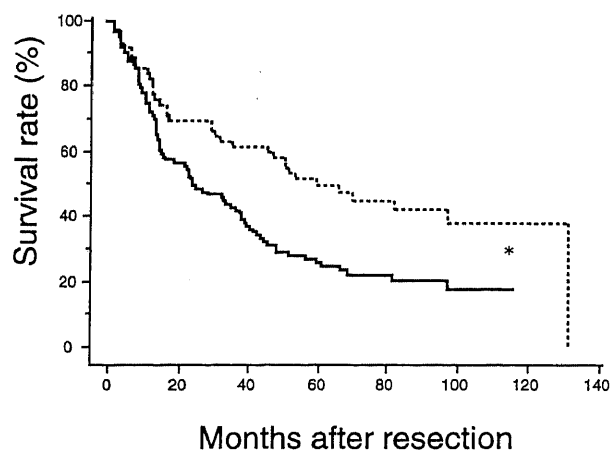


Fig.8. Survival curves of non-small cell lung cancer patients with p53 protein positive and negative. —, p53 protein positive cases; ----, p53 protein negative cases. * $p < 0.05$, by Logrank test.

Table 2. Bcl-2 and p53 expression in lung cancers

Expression of p53 protein	No. of cases	No. of cases	
		Expression of Bcl-2 protein	
		Positive	Negative
Positive	105	30	75
Negative	63	20	43

The χ^2 test showed that the difference was not significant.

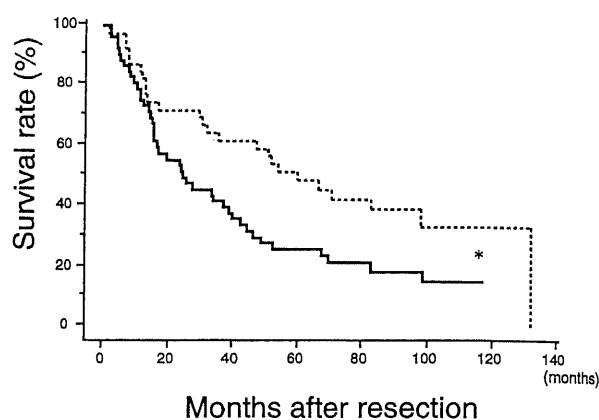


Fig.9. Survival curves of patients with adenocarcinoma patients with p53 protein positive and negative. —, p53 protein positive cases; ----, p53 protein negative cases. * $p < 0.05$, by Logrank test.

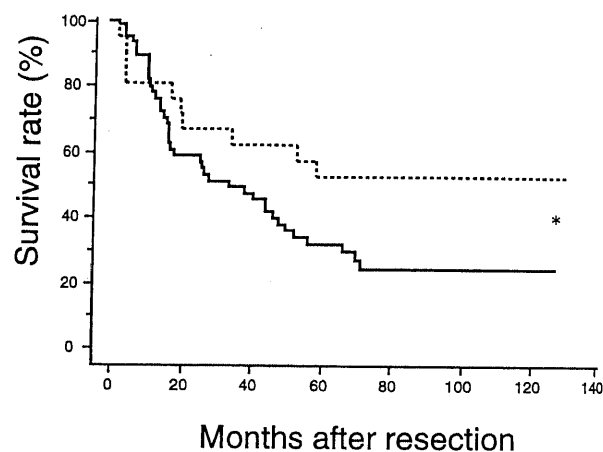


Fig.10. Survival curves of patients with epidermoid carcinoma patients with p53 protein positive and negative. —, p53 protein positive cases; ----, p53 protein negative cases. * $p < 0.05$, by Logrank test.

Table 3. Results of Cox hazard model analyses of prognostic factors on lung cancers

Variables	χ^2	p value
Early stage (stage I + II)	34.497	<0.0001*
Bcl-2 expression-positive	3.457	0.6320
p53 expression-negative	10.656	0.0011*

In all patients, the disease stage and p53 expression negative were significant prognostic factors. * $p < 0.05$.

Table 4. Results of Cox hazard model analyses of prognostic factors on adenocarcinoma patients

Variables	χ^2	p value
Early stage (stage I + II)	12.723	0.0004*
Bcl-2 expression-positive	0.249	0.6157
p53 expression-negative	7.043	0.0080*

In adenocarcinoma patients, the disease stage and p53 expression negative were significant prognostic factors. * $p < 0.05$.

Table 5. Results of Cox hazard model analyses of prognostic factors on epidermoid carcinoma patients

Variables	χ^2	p value
Early stage (stage I + II)	22.095	<0.0001*
Bcl-2 expression-positive	8.510	0.0350*
p53 expression-negative	2.969	0.8490

In epidermoid carcinoma patients, the disease stage and bcl-2 expression positive were significant prognostic factors.

67.5% (54/80例) との間に差はなかった。性別, 年齢 (60歳以上, 60歳未満), 組織型, T因子, N因子, M因子による差もなかった。

p53蛋白発現陽性/陰性別の全症例の遠隔期生存率は, 12ヶ月生存率で75.0%/83.9% (陽性/陰性, 以下同様), 36ヶ月生存率で42.9%/61.3%, 60ヶ月生存率で25.8%/49.7%であり, p53蛋白陰性例は陽性例に比し有意に生存率が良好であった ($p<0.05$) (図8)。組織型別にみた場合, 腺癌症例の遠隔期生存率は, 12ヶ月生存率で75.0%/84.7% (陽性/陰性, 以下同様), 36ヶ月生存率で41.5%/61.6%, 60ヶ月生存率で25.7%/48.5%であり, p53蛋白陰性例は陽性例に比し有意に生存率が良好であった ($p<0.05$) (図9)。扁平上皮癌症例の遠隔期生存率は, 12ヶ月生存率で75.0%/81.0% (陽性/陰性, 以下同様), 36ヶ月生存率で44.2%/61.9%, 60ヶ月生存率で25.6%/52.4%であり, p53蛋白陰性例は陽性例に比し有意に生存率が良好であった ($p<0.05$) (図10)。

Ⅲ. Bcl-2 蛋白発現とp53蛋白発現との相関

p53蛋白発現陽性例と陰性例の間は Bcl-2 蛋白発現陽性率に有意差は認められなかった (表2)。

Ⅳ. Bcl-2 蛋白発現とp53蛋白発現の予後因子としての比較

全症例, 組織型別 (腺癌, 扁平上皮癌) のいずれの検討でも, I, II 病期は最も予後に関与する因子であった ($p<0.01$) (表3, 4, 5)。Bcl-2 蛋白発現は扁平上皮癌症例にのみ予後に有意に関与した ($p<0.05$)。一方, p53蛋白発現は全症例, 腺癌症例に予後に有意に関与した ($p<0.05$)。

考 察

近年アポトーシスに対する関心が高まり, 癌, 自己免疫疾患, ウイルス感染症などとの関与が示唆されるようになり, アポトーシス制御の解明が重要な課題となっている。この制御には癌遺伝子, 癌抑制遺伝子, ウイルス遺伝子などが関わっているとされるが, そのうちの Bcl-2 はヒト濾胞性Bリンパ腫に付随した染色体転座の解析から同定された癌遺伝子であり, アポトーシスに対しては抑制的に働くといわれている。Bcl-2 の発現によりアポトーシスが抑制され, 細胞寿命が延びることにより, 腫瘍発生に必須な遺伝子変化の生じる機会が増加すると考えられている。さらに, Bcl-2 蛋白発現が細胞増殖にも関与している可能性も示唆されており²³, その発癌機構への関わりにはまだ解明されていない部分も多い。また抗癌剤によってひき起こされる癌細胞のアポトーシスが Bcl-2 の発現によって阻害され, 抗癌剤への抵抗性を高めているとの報告²⁴や, 肺癌細胞において Bcl-2 蛋白の発現が放射線誘発アポトーシス発現の調節因子となっているとの報告²⁵もあり, 発癌との関与のみならずアポ

トーシスを介して癌の挙動にさまざまに関わっている興味深い遺伝子といえる。

正常組織での Bcl-2 蛋白発現は脾臓や胸腺などのリンパ系組織と中枢神経系におもにみられる¹¹⁾が, 小腸や皮膚といった一部の上皮組織でも基底細胞に限って発現がみられるという¹²⁾。腫瘍性病変における Bcl-2 蛋白発現に関してもリンパ腫に関する報告が多い¹³⁾¹⁴⁾が, 上皮性腫瘍についても乳癌¹⁵⁾¹⁶⁾, 消化器癌¹⁷⁾, 肺癌 (小細胞癌^{18)・20)}および非小細胞癌^{21)・26)}等での発現を検討した報告が散見される。これまでの非小細胞肺癌における Bcl-2 蛋白発現と臨床病理学的予後因子に関する検討では, 扁平上皮癌²¹⁾²⁴⁾, 病期の早いもの²²⁾²³⁾, 予後の良好なもの^{21)・23)}に高く発現したとの報告があり, Bcl-2 蛋白発現が癌発生の初期の段階に働くのではないかと²³⁾²⁴⁾とする考え方が支配的である。

Walkerら²⁶⁾は気管支上皮における Bcl-2 蛋白の発現を正常気管支上皮, 異形成をおこした気管支上皮および肺癌症例の気管支上皮で免疫組織染色を用いて検討しているが, Bcl-2 蛋白の発現が増強するほど異形成の程度が著しくなったと報告している。また米田ら²⁰⁾は Bcl-2 蛋白陽性の扁平上皮癌症例の染色像を観察し, 基底細胞より発生したと考えられる癌細胞には Bcl-2 蛋白発現が認められるが, 正常気管支円柱上皮には発現は認められず, 細胞の分化, 脱分化の時間的経過と Bcl-2 蛋白発現の関係を示唆している。

本研究では臨床病期が進むにつれ Bcl-2 蛋白発現陽性率は下がる傾向があったものの, 有意差を認めるまでには至らなかった。病理組織別では腺癌に比べ, 扁平上皮癌で有意に発現が高いという結果が得られた。また扁平上皮癌においては Bcl-2 蛋白発現陽性症例は陰性症例に比べて有意に予後が良好であった。さらに Bcl-2 蛋白発現はT因子, N因子との相関が認められず, これらとは独立した予後因子である可能性が示唆された。しかし腺癌では Bcl-2 蛋白発現陽性例, 陰性例で予後に差はなく, 扁平上皮癌に特異的な予後因子である可能性がある。これらの結果は, 扁平上皮癌は気管支の基底細胞由来と考えられること, また一部の上皮組織でも基底細胞に限って Bcl-2 蛋白発現が認められることなどと考えあわせると発癌のひとつのパターンとして次のようなものと考えられる。まず正常基底細胞での Bcl-2 遺伝子の発現がおこり, アポトーシスが抑制されて本来の細胞寿命をすぎても細胞が生存しているうちに発癌をおこしうる遺伝子異常がおこり癌細胞が増殖する。そして本来直接的には細胞を癌化しない Bcl-2 遺伝子をもった細胞は癌化した増殖のさかんな細胞に置き換えられる。癌化した細胞の一部はその増殖の過程で Bcl-2 遺伝子の欠損や変異をおこし Bcl-2 蛋白が誘導されなくなる。この過程は仮説の域を出ないが, Bcl-2 蛋白発現におけるさまざまな現象を説明しうる。いずれにしても Bcl-2 遺伝子は発癌や癌の進展, 癌治療に対する抵抗性など癌に関するさまざまな問題を解く重要な遺伝子であることは間違いない。

一方p53遺伝子は肺癌においてその関与が確実視されている癌抑制遺伝子のひとつで²⁷⁾, 野生型と変異型があることが明らかになっている。野生型p53遺伝子は細胞の DNA が損傷を受けたときに p53 蛋白を誘導し細胞を G1 期で停止させる働きがある²⁸⁾。このように細胞周期を調節することにより細胞増殖に関わる遺伝子である²⁹⁾。また野生型p53には細胞周期の調節のみならずアポトーシスを誘導する働きがあることが明らかになった³⁰⁾。そしてp53遺伝子欠損マウスでは胸腺細胞への放射線

照射をおこなってもアポトーシスが誘導されないことからDNA損傷により誘導されるアポトーシスに野生型p53が必須であると考えられている³¹⁾³²⁾。いったんDNAが損傷されるとp53が誘導され細胞はG1期で停止し、アポトーシスにより排除されるかDNA修復がおこなわれるはずであるが、このときp53に欠損あるいは変異があった場合には未修復のまま細胞増殖がすすみ腫瘍発生を容認してしまう可能性がある³³⁾。以上のように変異型p53は野生型p53本来の機能を持たず、逆にアポトーシスを抑制すると考えられる。野生型p53に誘導されるp53蛋白の半減期が20~30分で不安定であるのに対し変異型p53に誘導されるp53蛋白の半減期は6~7時間であるため³⁴⁾、腫瘍組織を免疫組織染色したときに同定されるp53蛋白は変異型のものの比率が高いと思われる。

悪性腫瘍におけるp53蛋白発現の予後因子としての意義はこれまでも検討されてきた。胃癌³⁵⁾、乳癌³⁶⁾などにおいてもその発現例は予後が不良といわれている。教室の家接³⁷⁾も非小細胞性肺癌においてp53蛋白発現例の検討を行っているが、発現がみられたものは、腫瘍増殖能が高く、p53蛋白陽性は予後不良因子となりうると結論している。今回の研究でも同様にp53蛋白発現陽性例は予後が不良であることが示されたが、p53蛋白発現陽性率とT因子、N因子、M因子、病期との相関が認められず、これらとは独立した予後因子である可能性が示唆された。

またBcl-2遺伝子とp53遺伝子の相互作用に関しては変異型p53遺伝子はBcl-2遺伝子の発現を阻害する¹⁵⁾³⁸⁾といわれており、実際乳癌において両者は負の相関を示していたが、今回の研究では非小細胞肺癌において両者の相互関係は認められなかった。

変異型p53遺伝子は前述のように、野生型p53遺伝子がアポトーシスを惹起するのとは逆にアポトーシスを抑制するが、同じくアポトーシスを抑制するBcl-2遺伝子とはその発現と予後との関係において全く逆の結果を示した。Ohsakiら²⁰⁾はBcl-2遺伝子の発現が腫瘍発生早い時期に起こる現象であり、p53遺伝子の変異も発癌の重要なかぎを握る現象であるが、p53遺伝子は癌の悪性度を維持することにも何らかの役割を果たしているのではないかと考察している。Bcl-2遺伝子もp53遺伝子もアポトーシスを介して発癌に関わっていると思われるが、発生した腫瘍におけるその役割は今後のさらなる検討を待たねばならない。

結 論

原発性非小細胞肺癌168例を対象にモノクローナル抗体を用いてBcl-2蛋白とp53蛋白の免疫組織染色を行い、以下の結論を得た。

1. Bcl-2蛋白発現陽性例は168例中50例(29.8%)であった。
2. Bcl-2蛋白発現陽性率は扁平上皮癌で有意に高く、扁平上皮癌症例における陽性例は陰性例に対し有意に予後が良好であった。
3. p53蛋白発現陽性例は168例中105例(62.5%)であった。
4. p53蛋白発現陰性例は陽性例に対し有意に予後が良好であった。
5. Bcl-2蛋白発現およびp53蛋白発現の予後因子としての有用性の検討では、Bcl-2蛋白発現は扁平上皮癌では有意に強く、予後と相関していたが腺癌では予後との関係は認められず、

p53蛋白発現は腺癌では有意に強く予後と相関していたが、扁平上皮癌では予後との相関は認められなかった。

以上、原発性非小細胞肺癌においてBcl-2蛋白発現とp53蛋白発現はともに予後因子となりうると考えられたが、Bcl-2蛋白発現に関しては、扁平上皮癌に特異的な予後因子である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を表します。またCAS200の使用に際し、御指導頂きました医学部付属病院病理部野々村昭孝助教授に心から感謝いたします。さらに本研究の遂行に際し、御協力を頂きました金沢大学外科学第一講座の皆様へ心から感謝致します。

文 献

- 1) 渡辺洋宇. 肺癌の予後因子. 日胸 54: 535-546, 1995
- 2) Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the Bcl-2 gene in follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443, 1985
- 3) 辻本賀英. Bcl-2 遺伝子とは. *Medical Immunology* 22: 127-131, 1991
- 4) 江崎幸治. Bcl-2 とアポトーシス. *臨床医* 29: 2092-2094, 1995
- 5) Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886, 1992
- 6) 関 秀俊, 宮脇利男. 癌関連遺伝子によるアポトーシスの制御. *Surgery Frontier* 2: 55-61, 1995
- 7) 辻本賀英. アポトーシス—細胞死の分子生物学—. 癌と化学療法21: 591-595, 1994
- 8) 日本肺癌学会編. 臨床・病理, 肺癌取り扱い規約, 改訂第4版, 23-30頁, 金原出版, 東京, 1995
- 9) Ohmori T, Podack CK, Nishio K, Takahashi M, Miyahara Y, Takeda Y, Kubota N, Funayama Y, Ogasawara H, Ohira S, Saijo N. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 30-36, 1993
- 10) 高仲 強. 肺癌細胞における放射線誘発アポトーシスの研究—Fas抗原およびBcl-2蛋白との関連—. 十全医会誌 105: 450-461, 1996
- 11) Negrini M, Silini E, Kozak C. Molecular analysis of m Bcl-2: structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell* 49: 455-463, 1987
- 12) Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6961-6965, 1991
- 13) Pezzella F, Ralfkiaer E, Gatter KC. The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 76: 58-64, 1994
- 14) Aisenberg A C, Wilkes BM, Jacobson JO. The Bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas. *Blood* 71: 969-972, 1988
- 15) Haldar S, Negrini M, Mone M, Sabbioni S, Croce C M.

- Down-Regulation of Bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 54: 2095-2097, 1994
- 16) Gorczyca W, Markiewski M, Kram A, Tuziak T, Domagala W. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 and p53 expression in breast carcinomas: their correlation with Ki-67 growth fraction. *Virchows Archiv* 426: 229-233, 1995
 - 17) Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H, Seto M, Ueda R, Tahara E. Loss of heterozygosity at the Bcl-2 gene locus and expression of Bcl-2 in human gastric and colorectal carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 85: 584-591, 1994
 - 18) Kaiser U, Schilli M, Haag U, Neumann K, Kreipe H, Kogan E, Havemann K. Expression of Bcl-2-protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 15: 31-40, 1996
 - 19) Ikegaki N, Katsumata M, Minna J, Tsujimoto Y. Expression of Bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 54: 6-8, 1994
 - 20) Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R. High prevalence of Bcl-2 oncoprotein expression in small cell lung cancer. *Anticancer Res* 15: 503-505, 1995
 - 21) Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter KC, Mason DY. Bcl-2 protein in non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 329: 690-694, 1993
 - 22) Fontanini G, Vignati S, Bigini S, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, Basolo F, Bevilacqua G. Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 71: 1003-1007, 1995
 - 23) Ohsaki Y, Toyosima E, Fujiuchi S, Matsui H, Hirata S, Miyokawa N, Kubo Y, Kikuchi K. Bcl-2 and p53 protein expression in non-small cell lung cancers: correlation with survival time. *Clin Cancer Res* 2: 915-920, 1996
 - 24) 米田 敏, 白田高歩, 川原克信, 草野卓雄, 岩崎昭憲, 山下純一, 岡林 寛, 白石武史, 田代光太郎, 大島孝一. 原発性非小細胞肺癌におけるBcl-2蛋白発現に関する検討. *肺癌* 35: 857-863, 1995
 - 25) 陳 炎, 齊藤泰紀, 佐藤雅美, 佐川元保, 高橋博人, 遠藤千顕, 桜田 晃, 相川広一, 蒲田勝男, 藤村重文. 非小細胞肺癌におけるBcl-2蛋白, アポトーシスおよびp53蛋白の免疫組織学的検討. *肺癌* 36: 785-790, 1996
 - 26) Walker C, Robertson L, Myskow M, Dixon G. Expression of Bcl-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 72: 164-169, 1995
 - 27) Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246: 491-494, 1989
 - 28) Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311, 1991
 - 29) Levine AJ. The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 326: 1350-1352, 1992
 - 30) Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345-347, 1991
 - 31) Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne B A, Jacks T. P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847-849, 1993
 - 32) Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849-852, 1993
 - 33) Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992
 - 34) Levine AJ, Momand J, Finlay C A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991
 - 35) Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 50: 859-862, 1992
 - 36) Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, Tamaki K, Tamakuma S, Fukutomi T, Mukai K, Hirohashi S. Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 82: 835-840, 1991
 - 37) 家接健一. 原発性非小細胞肺癌におけるp53蛋白発現および腫瘍増殖能に関する研究. *十全医会誌* 102: 492-505, 1993
 - 38) Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed J C. Identification of a p53-dependent negative response element in the Bcl-2 gene. *Cancer Res* 54: 3131-3135, 1994

Bcl-2 and p53 Protein Expression in Non-small Cell Lung Cancers: Correlation with Survival Time Yumiko Ohtake, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 106, 96—104 (1997)

Key words non-small cell lung cancer, Bcl-2 protein, p53 protein, apoptosis, prognostic factor

Abstract

To examine Bcl-2 and p53 protein expressions and their impacts on survival time in lung cancers, 168 resected non-small cell lung cancer specimens were studied by the immunohistochemical method. The Bcl-2 protein expression was noted in 29.8% of all patients. The degree of the Bcl-2 protein in epidermoid carcinoma (38.4%) was higher than that in adenocarcinoma (23.7%) ($p < 0.05$). No relationship was observed between Bcl-2 protein expression and other clinicopathological parameters such as sex, age, staging, tumor status, nodal metastasis and distal metastasis. However the degree of the Bcl-2 protein expression in stages I + II was higher than that in stages III + IV. In epidermoid carcinoma, a Bcl-2 protein expressing group showed a better survival rate than a non-expressing group. But this difference was not found in adenocarcinoma patients. A p53 protein expression was noted in 62.5% of all patients, and no relationship was observed between the degree of p53 protein expression and other clinicopathological parameters such as sex, age, histology, staging, tumor status, nodal metastasis and distal metastasis. However the degree of the p53 protein expression in stages I + II was lower than in stages III + IV. A p53 protein positive group showed a poorer survival rate than a negative group. These findings suggest that Bcl-2 protein expression is histologically specific, and the Bcl-2 expression in epidermoid carcinoma patients is a potentially valuable prognostic factor. In addition, p53 protein expression might be a potentially valuable prognostic factor in non-small cell lung cancer, particularly in adenocarcinoma.